

## DAYA HAMBAT FLAVONOID NARINGENIN DAN NARINGIN TERHADAP AKTIVITAS GST KELAS $\mu$ HATI TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) SECARA *IN VITRO*

Sudibyo Martono<sup>1</sup>, Wahyu Utami<sup>2</sup>

### INTISARI

Martono, S., dan W. Utami, 2005. Daya hambat flavonoid naringenin dan naringin terhadap aktivitas GST kelas  $\mu$  hati tikus (*Rattus norvegicus* L.) secara *in vitro*. Biologi 4 (6) : 395-409.

Naringenin telah dilaporkan menghambat glutathione S-transferase (GST) kelas umum ( $\alpha$ ,  $\mu$ , dan  $\pi$ ), namun belum diketahui pasti GST kelas  $\alpha$ ,  $\mu$ , atau  $\pi$  yang dihambat. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi hambatan naringenin dan naringin terhadap aktivitas GST kelas  $\mu$  hati tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar.

Untuk merepresentasikan aktivitas GST kelas  $\mu$  digunakan substrat spesifik untuk GST kelas  $\mu$  yaitu 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) pada reaksi konjugasi dengan glutathione (GSH) yang diukur secara spektrofotometri. Uji penghambatan dilakukan dengan penambahan naringin atau naringenin pada uji aktivitas GST tersebut. Nilai  $IC_{50}$  (konsentrasi naringin atau naringenin yang menghasilkan 50% penghambatan aktivitas GST) dihitung menggunakan persamaan garis regresi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi naringin atau naringenin yang ditambahkan dan % inhibisi yang dihasilkan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa naringenin dan naringin keduanya menghambat aktivitas GST hati tikus kelas  $\mu$  dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut adalah 93,91  $\mu$ M dan 179,63  $\mu$ M.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa aktivitas GST kelas  $\mu$  hati tikus (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar dihambat lebih kuat oleh naringenin dibanding naringin.

Kata kunci : naringenin, naringin, glutathione S-transferase kelas  $\mu$ , 1,2-dikloro-4-nitrobenzen.

### ABSTRACT

Martono, S., and W. Utami, 2005. Inhibitory potency of naringenin and naringin flavonoids on the  $\mu$  class of rat's (*Rattus norvegicus* L.) liver GST activity *in vitro*. Biologi 4 (6) : 395-409.

Naringenin has been reported to be inhibitor of general classes ( $\alpha$ ,  $\mu$ , and  $\pi$ ) of glutathione S-transferase (GST), but it had not been known yet the kind of GST ( $\alpha$ ,  $\mu$ , or  $\pi$ ) which was inhibited by naringenin. The objective of this research was to know the inhibitory potency of naringin and naringenin on  $\mu$  class rat's liver GST activity *in vitro*.

To represent the  $\mu$  class of GST activity, 1,2-dichloro-4-nitrobenzen (DCNB) used as a

<sup>1</sup> Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

<sup>2</sup> Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

specific substrate on the conjugation reaction with glutathione (GSH) spectrophotometrically. In determining  $IC_{50}$  (the concentration of naringin or naringenin which resulting in 50% of inhibitory potency on GST activity), the activity test of GST was added with naringin and naringenin in vary of concentration.  $IC_{50}$  was obtained from linear regression curve which stated the correlation between the concentration of naringin or naringenin which was added and % of inhibition resulted.

The result showed that the  $\mu$  class of rat's liver GST (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar was inhibited by naringenin and naringin, with  $IC_{50}$  values were 93,91  $\mu$ M and 179,63  $\mu$ M, respectively.

From the research's result (based on the  $IC_{50}$  values), it can be concluded that the  $\mu$  class of rat's liver GST activity was stronger inhibited by naringenin than that of naringin.

**Keywords :** naringenin, naringin,  $\mu$  class glutathione S-transferase, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene.

## PENDAHULUAN

Diantara enzim detoksifikasi fase II, glutation S-transferase (GST) merupakan keluarga enzim yang mengkatalisis konjugasi bahan kimia reaktif dengan glutation (GSH) dan berperan utama pada perlindungan sel (Nakamura *et al.*, 2000). GST merupakan protein dimer yang terlibat dalam proses detoksifikasi sejumlah besar organisme (Stevens *et al.*, 2000). Reaksi yang berhubungan dengan GSH dan dikatalisis oleh GST memainkan peran utama pada detoksifikasi molekul-molekul karsinogenik dan toksik elektrofilik (Nilsson *et al.*, 2000).

Berdasarkan spesifisitas substrat, titik isoelektrik, dan homologi sekuen asam amino, isoenzim sitosolik GST diklasifikasikan ke dalam kelas  $\alpha$  (alpha),  $\mu$  (mu),  $\pi$  (pi), dan  $\theta$  (theta) (Nacol *et al.*, 1999). GST  $M_1$  termasuk keluarga GST $\mu$ , disamping empat isoenzim lainnya. Perokok dengan kondisi

defisiensi GST  $M_1$  memiliki resiko peningkatan terkena kanker: paru, laring, dan kandung kemih secara signifikan (Lafuente *et al.*, 1993) serta kanker payudara dan kolon (Zhong *et al.*, 1993). Pada sel tumor, sering dijumpai satu atau lebih isoenzim GST mengalami peningkatan, yang berarti bahwa sel tumor menunjukkan profil aktivitas yang berbeda dengan profil aktivitas sel normal. Ada dugaan kuat bahwa GSH dan enzim yang terkait (GST) memegang peranan pada proses resistensi sel terhadap obat antikanker. Pada tumor paru, dilaporkan juga terjadi peningkatan berlebihan GST kelas  $\mu$  (Black & Wolf, 1991).

Dengan peningkatan berlebihan aktivitas GST kelas tertentu tersebut, maka terapi sel kanker dengan obat-obat sitostatik elektrofili seringkali mengalami resistensi karena sebagian besar obat sitostatik justru dimetabolisme melalui

konjugasi GSH yang dikatalisis oleh GST dibanding yang berefek terhadap sel kanker. Detoksifikasi beberapa obat antikanker seperti 1,3-bis-(2-kloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), klorambusil, siklofosamid, melpalan, dan tiotepa mengalami konjugasi dengan GSH dengan katalis GST (Hayes & Pulford, 1995). Apabila kanker tersebut disertai dengan peningkatan GST berlebihan, maka dapat terjadi penurunan efektivitas obat sitostatik yang digunakan pada terapi kanker tersebut. Pada keadaan seperti ini, untuk meningkatkan efektivitas terapi obat-obat sitostatik elektrofil dapat ditempuh strategi melalui penggunaan bersama antara obat sitostatik tersebut dengan inhibitor GST yang selektif.

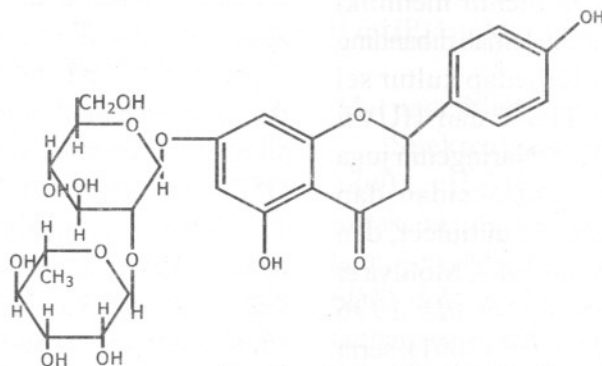
Struktur naringin dan naringenin, seperti ditunjukkan pada Gambar 1. dan 2. (Mcintosh & Mansell, 1990). Naringin dengan nama kimia 4',5,7-trihidroksi flavanon-7-rhamnoglukosida (Gambar

1.) merupakan glikosida utama dalam buah anggur dan beberapa jenis Citrus (Hou *et al.*, 2001; Erlund *et al.*, 2001).

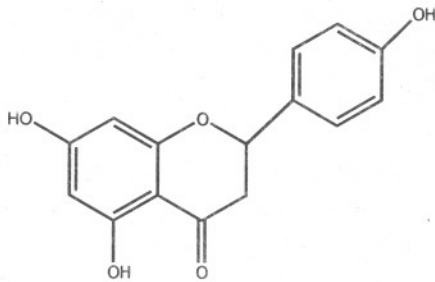
Telah dilaporkan bahwa naringin memiliki aktivitas antiinflamasi (Al-Meshal *et al.*, 1986), antiulcer (Martin *et al.*, 1994), antioksidan dan penangkap superoksida (Chen *et al.*, 1990), serta mampu meredam radikal bebas (Windono *et al.*, 2004).

Naringenin (4',5,7-trihidroksiflavon) (Gambar 2.) merupakan bioflavonoid tanaman yang tergolong flavanon. Sebagai sumber utama naringenin adalah buah jeruk dan tomat. Dalam buah jeruk, naringenin utamanya berada sebagai glikosida naringin dan narirutin, sedangkan dalam buah tomat naringenin berada sebagai polifenol dengan kelimpahan terbesar pada kulit (0,8-4,2 mg/100 g buah tomat merah) (Bugianesi *et al.*, 2002).

Naringenin dilaporkan mampu



Gambar 1. Struktur Naringin



Gambar 2. Struktur Naringenin

menghambat sekresi apolipoprotein B dari sel HepG2 yang terstimulasi oleat (Borradaile *et al.*, 2002) dan penurunan aktivitas MTP (Wilcox *et al.*, 2001). Peneliti lain melaporkan bahwa naringenin mampu meningkatkan ekspresi reseptor LDL pada sel HepG2 melalui peningkatan SREB-1 yang diperantarai PI3K tidak bergantung pada fosforilasi IRS-1 (Borradaile *et al.*, 2003). Resiko terkena penyakit cerebrovascular dan asma juga dapat diturunkan dengan pemberian naringenin (Knekt *et al.*, 2002). Disamping itu, naringenin memiliki sitotoksitas jauh lebih lemah dibanding 3-hidroksiflavan terhadap kultur sel normal manusia TIG-1 dan HUVE (Matsuo *et al.*, 2005). Naringenin juga terbukti sebagai antioksidan dan penangkap superoksida, antiulcer, dan dilatasi aorta (Parmar, 1983; Motilva *et al.*, 1994; dan Rojas *et al.*, 1996 ketiganya sitasi Hou *et al.*, 2001), serta mampu meredakan radikal bebas (Windono *et al.*, 2004).

Dalam kaitannya dengan GST, naringenin pada konsentrasi rendah mampu meningkatkan aktivitas GST, sedangkan pada konsentrasi tinggi justru menurunkan aktivitas GST kelas umum dalam limfosit manusia (Yen *et al.*, 2003).

Senyawa-senyawa fenol alami (dalam tanaman) : asam elagat, asam ferulat, asam kafeat, dan asam klorogenat dilaporkan mampu menghambat aktivitas GST (Das *et al.*, 1984). Beberapa senyawa flavonoid yaitu fisetin, mirisetin, kaempferol, kuersetin, baikalein, kuersitrin, krisin, baicalin, morin, rutin, dan apigenin dilaporkan juga dapat menghambat aktivitas GST (Iio *et al.*, 1993).

Baru-baru ini, flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanolik daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) telah dilaporkan sebagai inhibitor *in vitro* GST kelas  $\mu$  hati tikus dan kelas umum ( $\alpha$ ,  $\mu$ , dan  $\pi$ ) paru, usus halus, dan ginjal tikus, namun tidak menghambat GST kelas  $\pi$  keempat organ tikus tersebut (Sudibyo *et al.*, 2004<sup>a</sup>). Suatu flavonoid baikalein dari akar *Scutellaria baicalensis* Georgi yang pernah dilaporkan sebagai inhibitor GST kelas umum hati kuda (Iio *et al.*, 1993), ternyata menunjukkan penghambatan yang sangat kuat terhadap GST kelas  $\pi$  ginjal tikus *Rattus norvegicus* strain Wistar (Sudibyo & Lilis, 2005).

Sejauh peneliti ketahui dari penelusuran pustaka, belum pernah ada

penelitian tentang pengaruh naringin dan naringenin terhadap aktivitas GST kelas  $\mu$  hati tikus secara *in vitro*. Penelitian naringenin terdahulu terkait dengan GST yang pernah dilaporkan adalah bahwa naringenin menghambat GST kelas umum limposit manusia (Yen *et al.*, 2003).

Permasalahan yang dapat dikemukakan adalah: apakah naringin dan naringenin menghambat aktivitas GST kelas  $\mu$  hati tikus, dan bagaimana kekuatan penghambatannya?

Telah dilaporkan bahwa senyawa-senyawa fenol (polifenol) alami, menghambat aktivitas GST. Naringin dan naringenin termasuk golongan flavonoid dan fenol (polifenol) alami. Naringenin telah dilaporkan menghambat lemah GST kelas umum limposit manusia, namun belum diketahui jenis GST mana yang dihambat. GSH dapat berkonjugasi dengan DCNB (substrat spesifik untuk GST kelas  $\mu$ ) dengan katalis GST dan produk yang terbentuk dapat diukur secara spektrofotometri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh naringin dan naringenin terhadap aktivitas GST kelas  $\mu$  hati tikus (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar secara *in vitro*.

Naringin dan naringenin merupakan flavonoid dalam buah tomat yang banyak dikonsumsi manusia. Bila terbukti keduanya merupakan penghambat aktivitas GST, maka proses detoksifikasi

senyawa elektrofilik (melalui konjugasi dengan GSH dan dikatalisis GST) dalam tubuh manusia yang mengkonsumsi tomat akan mengalami gangguan, dengan kemungkinan resiko terjadi peningkatan toksisitas senyawa elektrofilik tersebut bagi tubuh.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan penelitian

Naringenin, naringin, glutation, *bovine serum albumin* (BSA) dan reagen Folin Ciocalteu (Sigma Chem.Co.) Senyawa 1,2-dikloro-4-nitrobenzen (DCNB) (Aldrich). Etanol, natrium hidroksida, natrium karbonat, kupri sulfat, kalium natrium tartrat, kalium dihidrogenfosfat, dan dikalium hidrogen fosfat (kualitas p.a. E. Merck). Akuades dari Lab. Kimia Instrumental Fakultas Farmasi UGM. Tikus putih jantan *Rattus norvegicus* strain Wistar, umur 6 minggu (berat 100-150 g) dari Unit Pengadaan Hewan Percobaan (UPHP) UGM.

### Alat penelitian

Spektrofotometer (Hitachi U-2800), pH Meter (TOA HM-60S), ultrasentrifugator (Hitachi SCP 85H), homogenizer, neraca (Shimadzu tipe LS-6DT), *delivery pipette* (Gilson Pipetman berbagai ukuran).

### Penyiapan fraksi sitosol hati tikus yang mengandung glutathion S-transferase

Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.), galur Wistar, berat 100-150 g, sebanyak 10 ekor, ditempatkan dalam kandang dengan pemberian pakan pellet serta minum air ledeng *ad libitum*, selama 1 minggu. Tikus dipuasakan 24 jam sebelum dikorbankan. Hati tikus diambil dan langsung dimasukkan ke dalam larutan dapar fosfat dingin 0,1 M pH 7,5 dan dihomogenkan menggunakan blender dingin dengan kecepatan 3000 rpm. Fraksi sitosol hati tikus dipersiapkan dengan teknik ultrasentrifugasi homogenat hati tikus (hasil pemblenderan 3000 rpm) menurut Lundgren *et al.* (1987). Fraksi sitosol hati tikus yang diperoleh disimpan pada suhu  $-85^{\circ}\text{C}$  sampai saat digunakan. Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry (1951) menggunakan *bovine serum albumin* sebagai standar.

### Penentuan aktivitas GST kelas $\mu$ hati tikus

Aktivitas GST kelas  $\mu$  diukur secara spektrofotometri menurut metode Habig *et al.* (1974) pada reaksi konjugasi antara DCNB dan GSH. Reaksi dilakukan dalam kuvet volume 1 mL. Ke dalam kuvet dimasukkan 642,5  $\mu\text{L}$

0,1 M bufer fosfat pH 7,5; 17,5  $\mu\text{L}$  fraksi sitosol hati tikus (kadar protein tertentu yang menghasilkan laju reaksi linier); 75  $\mu\text{L}$  GSH 50 mM (dalam akuades); dan 15  $\mu\text{L}$  DCNB 50mM (dalam etanol). Produk konjugat GS-CNB hasil reaksi konjugasi antara GSH dan DCNB dengan katalis GST diukur secara spektrofotometri pada  $\lambda$  345 nm dari menit ke 0-3. Hasil pengukuran secara spektrofotometri berupa laju reaksi (serapan/menit).

Pada penentuan  $\text{IC}_{50}$ , dilakukan percobaan dengan cara yang sama seperti pada penentuan aktivitas GST tersebut di atas, namun dengan penambahan (senyawa uji) inhibitor yaitu larutan naringin dan naringenin dalam etanol 95% sebanyak 7,5  $\mu\text{L}$  dari 5 macam seri konsentrasi dengan konsentrasi akhir dalam campuran inkubasi seperti pada Tabel 1. dan Tabel 2. Dilakukan inkubasi selama 4 menit pada suhu kamar ( $20-30^{\circ}\text{C}$ ) sebelum penambahan GSH dan DCNB. Volume larutan uji dikurangkan dari jumlah volume bufer fosfat. Selanjutnya, dilakukan dengan cara yang sama seperti pada penentuan aktivitas GST tanpa senyawa uji.

Kecepatan pembentukan produk konjugat (V) dan % inhibisi dihitung menggunakan rumus :



$$V \text{ (nmol/min/mg protein)} = \frac{\text{laju reaksi}}{\Delta\epsilon \text{ GS-CNB. tebal kuvet/kadar protein dalam campuran inkubasi}}$$

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{V_{\text{tanpa inhibitor}} - V_{\text{dengan inhibitor}}}{V_{\text{tanpa inhibitor}}} \times 100\%$$

$\Delta\epsilon$  GS-CNB pada 345 nm = 8,5 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Habig *et al.*, 1974).

Kemudian dibuat persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi naringenin atau naringin (5 macam) dan % inhibisi yang dihasilkan. Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh menggunakan persamaan garis regresi tersebut, dengan cara memasukkan angka 50 pada Y (persamaan  $Y = bX + a$ ), maka akan didapat nilai X yang berarti = nilai IC<sub>50</sub> (dalam μM).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini penentuan aktivitas GST kelas μ menggunakan fraksi sitosol hati tikus karena kandungan GST kelas μ hati tikus paling tinggi dan hati merupakan organ pemetabolisme utama (Commandeur *et al.*, 1995) dan menggunakan substrat spesifik GST kelas μ yaitu DCNB (Mannervik & Danielson, 1988).

Pada Gambar 3., terjadi penurunan aktivitas GST kelas μ secara *gradual* seiring meningkatnya konsentrasi naringenin, yang berarti bahwa aktivitas GST mengalami penghambatan akibat

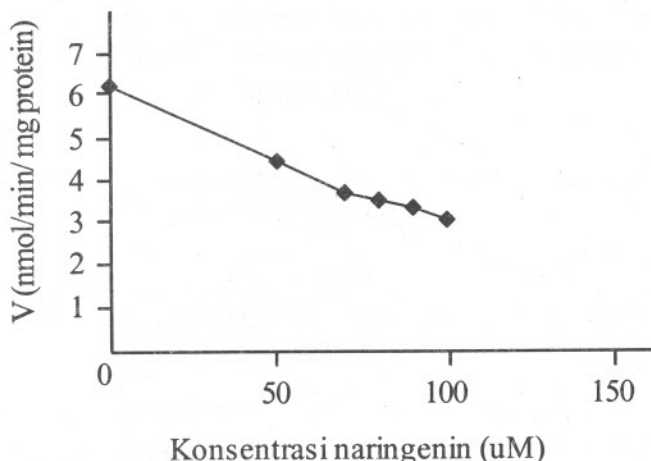
pemberian naringenin.

Hasil penentuan IC<sub>50</sub> menunjukkan bahwa naringenin menghambat aktivitas GST kelas μ dengan nilai IC<sub>50</sub> = 93,91 μM (Tabel 1).

Sementara, pada uji aktivitas GST akibat pemberian naringin, dapat dilihat bahwa naringin juga menghambat aktivitas GST kelas μ hati tikus, namun tidak sekuat naringenin (Gambar 4.).

Kekuatan penghambatannya ditunjukkan dengan nilai IC<sub>50</sub> naringin (Tabel 2.), yaitu 184,10 ± 0,88 μM, yang kurang lebih dua kali lebih besar dibanding nilai IC<sub>50</sub> naringenin.

Berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> dapat dikatakan bahwa naringenin lebih kuat menghambat aktivitas GST kelas μ hati tikus dibanding naringin, terlihat dari nilai IC<sub>50</sub> naringenin = 93,91 μM, sementara nilai IC<sub>50</sub> naringin = 179,63 μM. Naringenin memiliki nilai IC<sub>50</sub> lebih kecil dibanding naringin, hal tersebut berarti untuk menghasilkan penghambatan 50% aktivitas GST, naringenin membutuhkan konsentrasi yang lebih kecil.



Gambar 3. Kurva hubungan konsentrasi naringenin dan aktivitas GST pada reaksi konjugasi GSH dengan DCNB yang dikatalisis oleh GST hati tikus

Tabel 1. Nilai % inhibisi dan  $IC_{50}$  naringenin pada reaksi konjugasi GSH dengan DCNB yang dikatalisis oleh GST hati tikus

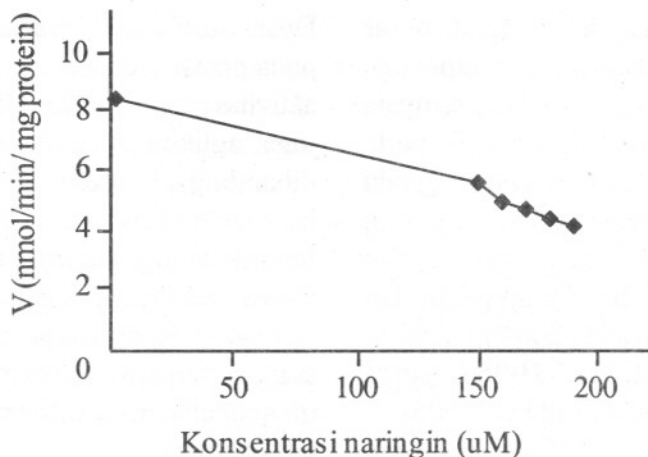
Pengukuran ke...	Konsentrasi naringenin ( $\mu M$ ) yang ditambahkan				
	50	70	80	90	100
	% Inhibisi yang dihasilkan				
1	30,14	38,14	44,20	46,83	55,04
2	27,91	42,36	45,69	49,11	51,19
3	29,63	42,03	44,04	46,00	52,30
4	29,59	42,99	44,92	47,12	52,14
Rata-rata	$29,32 \pm 0,97$	$41,38 \pm 2,20$	$44,71 \pm 0,76$	$47,27 \pm 1,32$	$52,17 \pm 0,76$
Pers. garis regresi linier : $Y = 0,441 X + 8,587$		$r = 0,987$		$IC_{50} = 93,91 (\mu M)$	

Keterangan:

Y = Rata-rata % inhibisi      X = konsentrasi naringenin      r = koefisien korelasi

$IC_{50}$  : Konsentrasi naringenin yang menghasilkan 50 % penghambatan aktivitas GST.





Gambar 4. Kurva hubungan konsentrasi naringin dan aktivitas GST pada reaksi konjugasi GSH dengan DCNB yang dikatalisis oleh GST hati tikus

Tabel 2. Nilai % inhibisi dan  $IC_{50}$  naringin pada reaksi konjugasi GSH dengan DCNB yang dikatalisis oleh GST hati tikus

Pengukuran ke...	Konsentrasi naringin ( $\mu M$ ) yang ditambahkan				
	50	70	80	90	100
	% Inhibisi yang dihasilkan				
1	34,76	46,22	46,84	49,47	51,76
2	35,33	43,3	46,93	49,77	53,98
3	35,78	43,45	47,72	49,68	54,2
Rata-rata	$35,29 \pm 0,51$	$44,3 \pm 1,64$	$47,16 \pm 0,48$	$49,64 \pm 0,15$	$53,31 \pm 1,35$
Pers. garis regresi linier :		$r = 0,960$			$IC_{50} = 179,63 (\mu M)$
$Y = 0,414 X - 24,368$					

Keterangan:

Y = Rata-rata % inhibisi      X = konsentrasi naringenin      r = koefisien korelasi

$IC_{50}$  : Konsentrasi naringenin yang menghasilkan 50 % penghambatan aktivitas GST.

Hingga saat ini sebagian besar senyawa-senyawa yang dilaporkan bersifat sebagai inhibitor GST ternyata memiliki bagian elektrofilik pada stukturinya (yang berperan mempengaruhi aktivitas GST) seperti pada: kurkumin dan derivatnya (Sudibyo, 1996, 2000; Sudibyo *et al.*, 2004<sup>b</sup>), apigenin dan luteolin (Sudibyo *et al.*, 2004<sup>a</sup>), baicalein (Sudibyo & Lilis, 2005), serta pentagamavunon-0 (Sudibyo, 2005).

Pada naringenin (Gambar 1.) dan naringin (Gambar 2.) yang termasuk flavonoid golongan flavanon, keduanya tidak mempunyai ikatan rangkap pada C<sub>2</sub> dan C<sub>3</sub> yang terkonjugasi dengan gugus karbonil pada C<sub>4</sub> yang dapat bermesomeri menghasilkan pusat elektrofilik dan akan mempengaruhi aktivitas GST. Menurut Sudibyo (2000) dapat dikategorikan bahwa baik naringin maupun naringenin secara lemah mempengaruhi aktivitas GST, terlihat dari nilai IC<sub>50</sub> yang dihasilkan (Tabel 1. dan Tabel 2.).

Selain diperlukannya ikatan rangkap pada C<sub>2</sub> dan C<sub>3</sub> yang terkonjugasi dengan gugus karbonil pada C<sub>4</sub>, keberadaan gugus OH fenolik pada struktur kimia senyawa uji juga menentukan penghambatan aktivitas GST. Dari penelitian yang dilakukan Iio *et al.* (1993) dilaporkan bahwa tingkat kekuatan penghambatan GST sangat dipengaruhi oleh jumlah gugus OH bebas maupun kedudukannya pada cincin.

Dikatakan bahwa tidak adanya gugus OH pada posisi 5 cincin A mempertinggi aktivitas penghambatan GST. Demikian juga, aglikon dilaporkan lebih poten dibanding glikosidanya dalam penghambatan aktivitas GST. Gugus OH fenolik diduga mampu menghambat aktivitas GST melalui pembentukan ikatan hidrogen dengan gugus hetero atom residu asam amino pada sisi aktif enzim sehingga mengubah konformasi enzim menjadi tidak aktif.

Jika dilihat struktur naringin (Gambar 1.), salah satu gugus OH terikat pada gula rhamnosa, sedangkan naringenin (Gambar 2.) merupakan aglikon dari naringin dan hanya mempunyai dua gugus OH pada cincin A, yang salah satunya pada posisi 5, sementara pada cincin B terdapat satu gugus OH. Dari Tabel 1. dan 2., terlihat bahwa naringenin secara signifikan lebih kuat menghambat aktivitas GST dibanding glikosidanya yaitu naringin ( $p < 0,05$ ). Hal ini memperkuat penelitian yang dilakukan Iio *et al.* (1993) bahwa aglikon lebih menghambat aktivitas GST dibandingkan glikosidanya. Hal tersebut karena adanya substitusi gula pada gugus OH posisi 7 (Gambar 1.) dengan akibat berkurangnya OH bebas yang diperlukan untuk penghambatan aktivitas GST. Selain itu, gugus gula rhamnosa yang begitu besar kemungkinan juga menimbulkan rintangan sterik saat berlangsungnya proses penghambatan aktivitas GST.

Naringin dan naringenin, keduanya termasuk senyawa fenol alami dan juga termasuk golongan flavonoid terbukti pada penelitian ini merupakan inhibitor GST kelas  $\mu$  hati tikus. Hasil tersebut memperkuat informasi sebelumnya yang dilaporkan oleh Das *et al.* (1984) dan Sudibyo *et al.* (2004<sup>a</sup>) tentang senyawa fenol alami dan laporan tentang aktivitas polifenol termasuk flavonoid seperti yang dilaporkan oleh Iio *et al.* (1993), Sudibyo *et al.* (2004<sup>a</sup>), dan Sudibyo dan Lilis (2005) yang kesemuanya menunjukkan penghambatan aktivitas GST oleh senyawa fenol.

Pernah dilaporkan bahwa naringin sebagai antiinflamasi (Al-Meshal *et al.*, 1986 sitasi Hou *et al.*, 2001), antioksidan dan penangkap radikal superoksida (Chen *et al.*, 1990 sitasi Hou *et al.*, 2001), serta menurunkan resiko terserang penyakit asma (termasuk inflamasi) (Knekt *et al.*, 2002). Beberapa senyawa antioksidan dan antiinflamasi diantaranya kurkumin dan derivatnya, serta pentagamavunon-0 telah terbukti merupakan inhibitor GST (Sudibyo, 1996, 2000, dan 2005; Sudibyo & Arief, 2003; Sudibyo *et al.*, 2004<sup>b</sup>). Inflamasi merupakan proses yang diperantarai oleh GST kelas  $\mu$  (Ujihara *et al.*, 1988; Samuelsson, 1980). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa baik naringin maupun naringenin terbukti sebagai inhibitor GST kelas  $\mu$  hati tikus. Nampaknya, hasil tersebut dapat

digunakan untuk membantu menjelaskan mekanisme antiinflamasi naringin dan naringenin.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Naringenin dan naringin menghambat GST kelas  $\mu$  hati tikus (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar secara *in vitro*.

Naringenin menghambat GST kelas  $\mu$  hati tikus lebih kuat dibanding naringin, dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut adalah 93,91  $\mu$ M dan 179,63  $\mu$ M.

### Saran

Perlu diteliti pengaruh naringin dan naringenin terhadap aktivitas GST kelas  $\pi$  secara *in vitro* dan *in vivo*, serta GST kelas  $\mu$  secara *in vivo*, mengingat kedua isoenzim GST tersebut paling sering dijumpai sebagai *marker* pada kasus kanker tertentu.

## PUSTAKA ACUAN

- Al-Meshal, I.A., M. Tariq, N.S. Parmar, and A.M. Ageel. 1986. Anti-inflammatory activity of the flavonoid fraction of khat (*Catha edulis* Forsk). *Agents Actions* 17: 379-380.
- Black, S.M. and C.R. Wolf. 1991. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. *Pharmacol. Ther* 51: 139-154.

- Borradaile, N.M., L.E. de Dreu, P.H.R. Barret, and M.W. Huff. 2002. Inhibition of hepatocyte apoB secretion by naringenin: enhanced rapid intracellular degradation independent of reduced microsomal cholesteryl esters. *J. Lipid Res* 43: 1544-1554.
- Borradaile, N.M., L.E. de Dreu, and M.W. Huff. 2003. Inhibition of Net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the Citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation. *Diabetes* 52: 2554-2561.
- Bugianesi, R., G. Catasta, P. Spigno, A. D'Uva, and G. Malani. 2002. Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *J. Nutr* 132 (11): 3349-3352.
- Chen, Y.T., R.L. Zheng, and Z.J. Jia. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 19-21.
- Commandeur, J.N.M., G.J. Stijntjes, and N.P.E. Vermeulen. 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacol. Rev* 47 (2): 271-330.
- Das, M., D.R. Bickers, and H. Mukhtar. 1984. Plant phenols as in vitro inhibitors of glutathione S-transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 120 (2): 427-433.
- Erlund, I., E. Meririnne, G. Alfthan, and A. Aro. 2001. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperitin in humans after ingestion of orange juice and grape fruit juice. *J. Nutr* 131 (2): 235-241.
- Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem* 249 (22): 7130-7139.
- Hayes, J.D., and D.J. Pulford. 1995. The glutathione S-transferases supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. in Biochem. and Mol. Biol* 30 (6): 445-600.
- Hou, Y.C., S.L. Hsiu, T.Y. Huang, C.Y. Yang, S.Y. Tsai, and P.D.L. Chao. 2001. Effect of honey and sugars on the metabolism and disposition of naringin in rabbits. *Planta Med* 67: 538-541.
- Iio, M., H. Kawaguchi, Y. Sakoto, J. Otonari, and H. Nitahara. 1993. Effects of polyphenols, including flavonoids, on glutathione S-transferases and glutathione reductase.

- Biosci. Biotech., Biochem* 57 (10): 1678-1680.
- Knekt, P., J. Kumpulainen, R. Jarvinen, H. Rissanen, M. Heliovaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, and A. Aromaa. 2002. Flavanoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr* 76: 560-568.
- Lafuente, A., F. Pujol, P. Carretero, J.P. Villa, and A. Cuchi. 1993. Human glutathione S-transferase mu (GST mu) deficiency as a marker for susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. *Cancer Lett* 68: 49-54.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagen. *J. Biol. Chem* 193: 265-275.
- Lundgren, B., J. Meijer, and J.W. DePiere. 1987. Characterization of the induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases by 2-ethylhexanoic acid in mouse liver. *Drug Metab. Dispos* 15: 114-121.
- Mannervik, B., and U.H. Danielson. 1988. Glutathione transferases-structure and catalytic activity, *CRC Crit. Rev. Biochem* 23: 283-337.
- Martin, M.J., E. Marhuenda, C. Perez-Guerrero, and J.M. France. 1994. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacol.* 49: 144-150.
- Matsuo, M., N. Sasaki, K. Saga, and T. Kaneko. 2005. Cytotoxicity of flavonoids towards cultured normal human cells. *Biol. Pharm. Bull* 28 (2): 253-259.
- Mcintosh, C.A., and R.L. Mansell. 1990. Biosynthesis of naringin in citrus paradisi: UDP-glucosyl-transferase activity in grapefruit seedlings. *Phytochemistry* 29 (5): 1533-1538.
- Nacol, S.L., B. Coudert, P. Colosetti, M. Riedinger, P. Fargeot, and P.B. Lecomte, P.B. 1999. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res* 1 (1): 80-87.
- Nakamura, Y., H. Ohigashi, S. Masuda, A. Murakami, Y. Morimitsu, Y. Kawamoto, T. Osawa, M. Imagawa, and K. Uchida. 2000. Redox regulation of glutathione S-transferase induction by benzylisothiocyanate: Correlation of enzyme induction with the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res* 60: 215-225.
- Nilsson, L.O., A. Gustaffson, and B. Mannervik. 2000. Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione S-transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA* 97 (17): 9408-9412.
- Stevens, J.M., R.N. Armstrong, and H.W. Dirr. 2000. Electrostatic interactions affecting the active site of class Sigma glutathione S-transferase. *Biochem. J* 347: 193-197
- Sudibyo, M. 1996. Inhibition effect of curcumin and its analogues on *in vitro* rat liver glutathione S-transferases activity. *Indon. J. Pharm* 7 (1): 39-51.
- Sudibyo, M. 2000. Inhibition of glutathione S-transferases by curcumin and its derivatives, Molecular mechanism and qualitative structure-activity relationship. *Dissertation*, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia.
- Sudibyo, M., dan R.H. Arief. 2003. Elusidasi mekanisme antiinflamasi pentagamavunon-0 melalui penghambatan aktivitas enzim glutathione S-transferase. *Gama Sains*, V (3): 157-163.
- Sudibyo, M., A. Fadli, Budianto, C.T. Astari, dan L.M. Aritonang. 2004<sup>a</sup>. Pengaruh ekstrak etanolik daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) *in vitro* terhadap aktivitas glutathione S-transferase beberapa organ *Rattus norvegicus* galur Sprague-Dawley. *Berkala Ilmiah Biologi* 3 (4): 231-242.
- Sudibyo, M., A.P. Samantha, dan Y. Nunung. 2004<sup>b</sup>. Perbandingan efek gamavuton dan kurkumin secara *in vitro* terhadap aktivitas GST kelas mu hati tikus. *Artocarpus Media Pharma-ceutica Indonesiana* 4 (2): 53-58.
- Sudibyo, M. 2005. Benzylidene cyclopentanone derivatives as inhibitors of rat liver glutathione S-transferase activities. *Indo. J. Chem* 5 (1): 71-75.
- Sudibyo, M., dan S. Lilis. 2005. Penghambatan baikalein flavonoid dari akar *Scutellaria baicalensis* terhadap aktivitas GST kelas pi ginjal tikus secara *in vitro*. *J. of Trad. Med / Majalah Obat Tradisional* 10 (33): 5-10.
- Samuelsson, B. 1980. The leukotrienes: a new group of biologically active compounds including SRS-A. *TiPS*, (May) 227-230.
- Ujihara, M., S. Tsuchida, K. Satoh, H. Sato, and Y. Urade. 1988. Biochemical and immunological demonstration of prostaglandin H2 by various GSTs isoenzymes. *Archs. Biochem. Biophys* 264: 428-437.
- Wilcox, L.J., N.M. Borradaile, L.E. de Derau, and M.W. Huff. 2001. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids,

naringenin and hesperitin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J. Lipid Res* 42: 725-734.

Windono, T., R. Budiono, Vone, S. Valentina, dan Y. Saputro. 2004. Studi hubungan struktur-aktivitas kapasitas peredaman radikal bebas senyawa flavonoid terhadap 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Artocarpus Media Pharmaceutica Indonesiana* 4 (2): 47-52.

Yen, G.C., P.D. Duh, H.L. Tsai, and S.L. Huang. 2003. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes, *Biosci. Biotechnol. Biochem* 67 (6): 1215-1222.

Zhong, S., A.H. Wyllie, D. Barnes, C.R. Wolf, and N.K. Spurr. 1993. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast, and colon cancer. *Carcinogenesis* 14: 1821-1824.